

## MOLECULAR-MASS DISTRIBUTION OF CASEIN PHOSHOPEPTIDES

V. Yukalo, L. Storozh, H. Karpyk

*Ternopil Ivan Puluj National Technical University*

### Key words:

*Casein  
Biologically active  
phosphopeptides  
Molecular-mass  
distribution*

### Article history:

Received 03.09.2018

Received in revised form  
20.09.2018

Accepted 10.10.2018

### Corresponding author:

V. Yukalo

### E-mail:

npnuht@ukr.net

### ABSTRACT

The additional functions of proteins of the casein complex of milk are manifested through the bioactive products of their proteolysis — peptides. Such peptides may affect on the functions of the digestive, cardiovascular, nervous and immune systems of the body. Among the bioactive casein peptides, one of the most important are phosphopeptides. Their main function is to transport provision and absorption of ions of bivalent metals by the body. They can also exhibit other biological effects. Obviously, such beneficial properties are natural or similar to natural phosphopeptides. Such peptides may be formed in conditions that occur in the gastrointestinal tract. When conducting proteolysis in such conditions, an important proof of the identity of the resulting phosphopeptides with natural ones is the molecular-mass distribution. In this regard, the purpose of the work was to characterize the molecular weight distribution of casein phosphopeptides obtained with the reproduction of the conditions of natural proteolysis.

Casein phosphopeptides were obtained as a result of proteolysis of the total phosphoproteins of cow's milk in conditions that occur in the gastrointestinal tract. The molecular weight distribution of the isolated phosphopeptides was determined using gel filtration. In this case, three types of sephadexes were used: G-10, G-15 and G-25. The composition and homogeneity of phosphoprotein substrates were analyzed electrophoretically in an alkaline system of the polyacrylamide gel. As a result of the fulfilled experiments, it was found that the prepared casein phosphopeptides, in the conditions close to proteolytic ones in the gastrointestinal tract, contained 52% of phosphopeptides with molecular weights of 700 to 1500 Da. In this range of the molecular masses, most of the known casein phosphopeptides of cow's milk are found. The obtained results were used during development of biotechnology for the separation of the natural casein phosphopeptides.

## МОЛЕКУЛЯРНО-МАСОВИЙ РОЗПОДІЛ КАЗЕЇНОВИХ ФОСФОПЕПТИДІВ

В.Г. Юкало, Л.А. Сторож, Г.В. Карпик

*Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя*

Додаткові функції протеїнів казеїнового комплексу молока проявляються через біоактивні продукти їх протеолізу — пептиди. Такі пептиди можуть впливати на функції травної, серцево-судинної, нервової та імунної систем організму. Серед біоактивних казеїнових пептидів одними з найважливіших є фосфопептиди. Їх основна функція — забезпечення транспортування і засвоєння організмом іонів двовалентних металів. Також вони можуть проявляти інші види біологічної дії. Очевидно, що такими корисними властивостями володіють природні або аналогічні до природних фосфопептиди, що можуть утворюватися в умовах, які мають місце у шлунково-кишковому тракті. При проведенні протеолізу в таких умовах важливим доказом ідентичності отриманих фосфопептидів природним фосфопептидам є молекулярно-масовий розподіл. У зв'язку з цим мета дослідження полягала в тому, щоб охарактеризувати молекулярно-масовий розподіл казеїнових фосфопептидів, отриманих з відтворенням умов природного протеолізу.

Казеїнові фосфопептиди було отримано в результаті протеолізу загального фосфопротеїну коров'ячого молока в умовах, які мають місце у шлунково-кишковому тракті. Молекулярно-масовий розподіл виділених фосфопептидів визначали за допомогою гель-фільтрації. При цьому було використано три типи сефадексів: G-10, G-15 і G-25. Склад і гомогенність фосфопротеїнових субстратів аналізували електрофоретично в лужній системі поліакриламідного гелю. В результаті було встановлено, що препарат казеїнових фосфопептидів, отриманий в умовах, близьких до умов протеолізу в шлунково-кишковому тракті, містить 52% фосфопептидів з молекулярними масами від 700 до 1500 Да. Цей діапазон молекулярних мас охоплює більшість відомих казеїнових фосфопептидів коров'ячого молока. Отримані результати були використані при розробці біотехнології виділення природних казеїнових фосфопептидів.

**Ключові слова:** казеїн, біологічно активні фосфопептиди, молекулярно-масовий розподіл.

**Постановка проблеми.** Фосфопротеїни у коров'ячому молоці становлять близько 79%. Їх біологічне значення пов'язане, зокрема, із збереженням стабільного стану значних кількостей іонів кальцію в молоці і сприянням їх ефективному засвоєнню організмом [1]. Залишки фосфату разом з іонами кальцію формують міцелярну структуру, що забезпечує секрецію концентрованих розчинів протеїнів, які містять великі кількості іонів кальцію без коагуляції. Також пориста структура фосфопротеїнів молока добре пропускає травні протеази шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [2].

Частина функцій фосфопротейнів проявляється через продукти їх протеолізу ензимами ШКТ — біоактивні фосфопептиди (БАФП) [3]. Окрім ШКТ, велику кількість різних БАФП було знайдено у різних молочних продуктах [4]. Починаючи з досліджень Міленде (1950 р.), у багатьох наукових публікаціях було підтверджено здатність казеїнових фосфопептидів зв'язувати іони макроелементів — кальцію, магнію, феруму, а також мікроелементів — цинку, нікелю, кобальту і селену [5]. Були відкриті інші види біологічної активності для БАФП [6]. Завдяки своїм властивостям казеїнові БАФП викликають значний інтерес як функціональні інгредієнти для харчових продуктів.

Звичайно, що корисної для організму біологічної дії можна сподіватися від природних або аналогічних природним БАФП. Отримання таких БАФП повинно проходити в умовах, які відтворюють процеси протеолізу в ШКТ [7]. У цьому випадку при використанні однакового субстрату (фосфопротейнів казеїнового комплексу), природних протеолітичних ензимів і умов протеолізу молекулярно-масовий розподіл може стати важливим доказом ідентичності отриманих фосфопептидів природним БАФП.

**Мета дослідження:** характеристика молекулярно-масового розподілу фосфопептидів, отриманих з відтворенням природного протеолізу фосфопротейнів казеїнового комплексу коров'ячого молока.

**Матеріали і методи.** Для виділення фосфопротейнів казеїнового комплексу використовували свіже знежирене коров'яче молоко кислотністю 18—19°Т. Загальний казеїн отримували потрійним переосадженням в ізоелектричній точці і подальшою інактивацією протеолітичних ензимів молока. Для ідентифікації протеїнів казеїнового комплексу виділяли фракції  $\alpha_{S1}$ -CN-8P і  $\beta$ -CN-5P диференційним осадженням з подальшим доочищенням іонообмінною хроматографією на колонках з ДЕАЕ-целюлозою (ДЕАЕ-52, «Serva») [8].

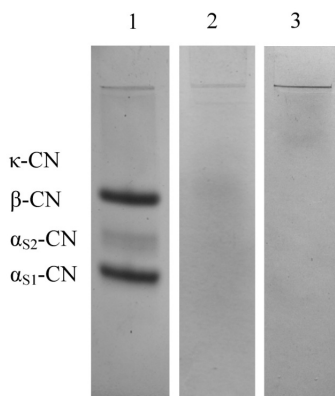
Концентрацію фосфопротейнів казеїнового комплексу молока визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46 ( $\lambda = 280$  нм). При цьому використовували такі коефіцієнти абсорбції  $D_{1\text{ cm}}^{1\%}$ : 8,2 — для загального казеїну; 10,1 — для  $\alpha_{S1}$ -CN-8P і 4,6 — для  $\beta$ -CN-5P.

Гель-фільтрацію фосфопротейнів і продуктів їх протеолізу проводили на колонках з набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal». При цьому були використані три типи декстранових гелів (G-10, G-15 і G-25) фірми «Reanal».

Склад і гомогенність фосфопротейнів казеїнового комплексу аналізували з використанням лужної буферної системи у вертикальних пластинках поліакриламідного гелю (ПАГ) [9]. Фіксування і фарбування пластинок гелю проводили загальноприйнятими методами. Денситометрію отриманих електрофореграм здійснювали, використовуючи функцію зчитування зображень *imread* у системі Matlab.

**Викладення основних результатів дослідження.** Для характеристики молекулярно-масового розподілу були виділені фосфопептиди в результаті протеолізу загального фосфопротейну коров'ячого молока. Умови протеолізу, визначені у [10], максимально відтворюють протеоліз у ШКТ. На електро-

фореграмі (рис. 1) показано результати електрофорезу виділеного фосфопро-  
теїнового субстрату (1), отриманих фосфопептидів (2) і високомолекулярних  
продуктів протеолізу, які осаджуються при рН 4,6 (3). Видно, що фосфо-  
пептиди мають малу молекулярну масу і практично не фіксуються в ПАГ.  
Частина осаджених при рН 4,6 продуктів протеолізу, які затримуються в гелі,  
є гетерогенною і не утворює чітких смуг.



**Рис. 1. Електрофреграма казеїну (1), казеїнових фосфопептидів (2) і продуктів  
протеолізу казеїну, які осаджуються при рН 4,6 (3)**

Оскільки розділення протеїнів і пептидів в електрофоретичній системі  
відбувається за їх зарядом, то отримані результати не можуть бути вико-  
ристані для характеристики молекулярно-масового розподілу. Такі дані  
можна отримати електрофорезом у ПАГ з додецилсульфатом натрію (ДСН).  
Проте з літературних даних відомо, що ДСН аномально взаємодіє з фосфо-  
протеїнами молока і не дає змоги адекватно визначити їхню молекулярну  
масу [3]. Тому для визначення молекулярно-масового розподілу фосфопепти-  
дів була вибрана ексклюзивна хроматографія.

Метод є відносно малоефективним при фракціонуванні складних сумішей  
протеїнів і пептидів. Проте, використовуючи комбінацію різних гелів, можна  
оцінити розподіл пептидів у гідролізатах за молекулярною масою. Враховуючи  
молекулярні маси відомих природних фосфопептидів, для аналізу були вибрані  
три найдрібнопористіші сефадекси: G-10, G-15 і G-25 («Pharmacia»). Сефадекс  
G-25 відносився до типу *fine* (діаметр гранул 20-80 мкм), сефадекси G-10, G-15  
характеризувалися діаметром гранул 40-120 мкм. Межа виключення пептидів і  
глобулярних протеїнів для вибраних сефадексів становить: G-10 — 700 Да;  
G-15 — 1500 Да; G-25 — 5000 Да.

Ексклюзивну хроматографію проводили в колонках фірми «Reanal» із  
загальним об'ємом 110 мл. Фосфопептиди розчиняли в оцтовій кислоті (5%),  
фільтрували і наносили на колонку для ексклюзивної хроматографії. Відбирали  
по 5 мл елюату в кожену фракцію. Концентрацію фосфопептидів у фракціях  
визначали спектрофотометрично. Також для кожного сефадексу визначали  
вільний об'єм з використанням високомолекулярних фосфопро-  
теїнових суб-  
стратів. Результати ексклюзивної хроматографії показані на рис. 2, 3 і 4.

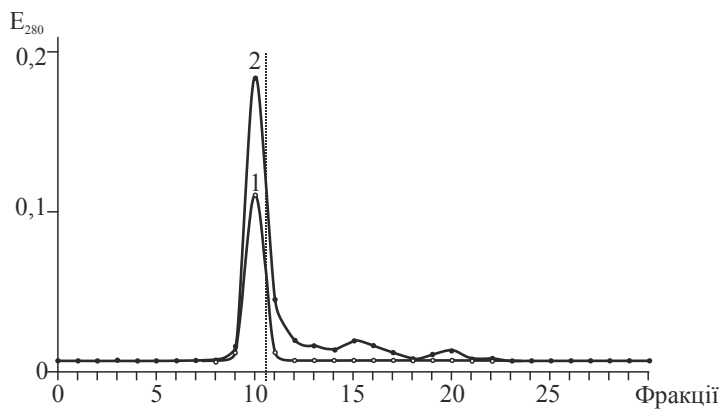


Рис. 2. Хроматограма загального казеїну (1) і фосфопептидів (2), отримана на сефадексі G-10

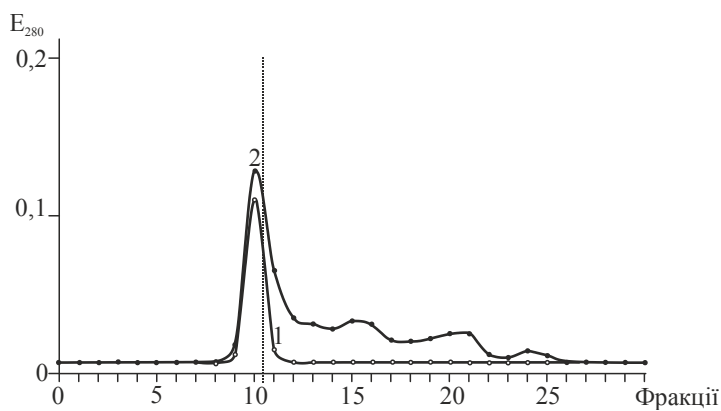


Рис. 3. Хроматограма загального казеїну (1) і фосфопептидів (2), отримана на сефадексі G-15

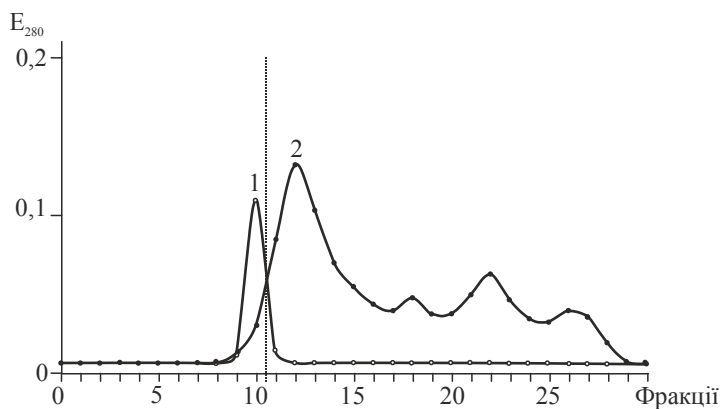
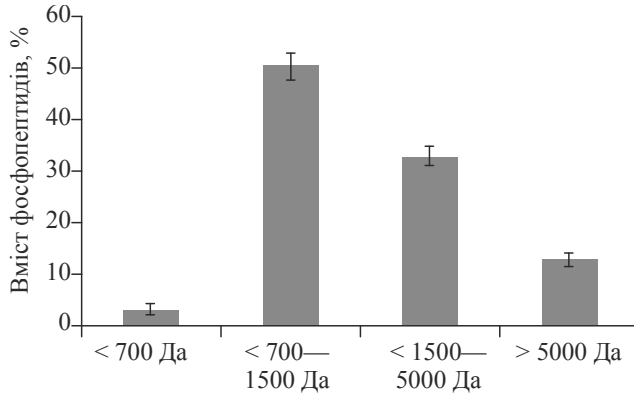


Рис. 4. Хроматограма загального казеїну (1) і фосфопептидів (2), отримана на сефадексі G-25

Усі фракції на хроматограмах у кожному випадку ділили на дві частини, як показано пунктирною лінією на графіках. Отримані фракції пептидів (права частина графіка) об'єднували, висушували при 70°C і зважували. За результатами трьох вимірювань було встановлено відсоток фосфопептидів: масою менше 700 Да; від 700 до 1500 Да; від 1500 до 5000 Да; більше 5000 Да. Результат показаний на рис. 5.



**Рис. 5. Молекулярно-масовий розподіл фосфопептидів за даними ексклюзивної хроматографії на сефадексах G-10, G-15 і G-25**

Основна частина фосфопептидів за молекулярною масою припадає на діапазон 700—1500 Да. В цьому діапазоні знаходяться відомі природні фосфопептиди ( $\alpha_{S1}$ -CN (f44-54)2P,  $\alpha_{S2}$ -CN (f55-64)4P,  $\beta$ -CN (f15-25)4P,  $\beta$ -CN (f30-36)1P). Також значна кількість фосфопептидів має молекулярну масу від 1500 до 5000 Да ( $\alpha_{S1}$ -CN (f59-79) 5P,  $\alpha_{S2}$ -CN (f1-21) 4P,  $\beta$ -CN (f1-25) 4P). Близько 3% казеїнових фосфопептидів є низькомолекулярними з молекулярною масою до 700 Да. Фосфопептиди з молекулярною масою вище за 5000 Да становлять лише 13% від загальної кількості. Природних фосфопептидів з такою молекулярною масою у літературі не описано [4]. Їх наявність у препаратах казеїнових фосфопептидів може бути пов'язана з високою гідрофільністю та зміщенням ізoeлектричної точки, внаслідок чого вони не осаджуються при рН 4,6 разом з продуктами обмеженого протеолізу фосфопротеїнових субстратів.

### Висновок

Отриманий препарат казеїнових фосфопептидів в умовах, близьких до природного протеолізу в шлунково-кишковому тракті людини, містить 52% фосфопептидів з молекулярними масами від 700 до 1500 Да. В цей діапазон молекулярних мас потрапляє більшість відомих біоактивних казеїнових фосфопептидів коров'ячого молока.

### Література

1. Huppertz T. Chemistry of Caseins. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Proteins: Basic Aspects*, 4th ed., Vol. 1A. New York: Springer, 2013. P. 130—160.

2. Holt C., Carver J.A., Ecroyd H., Thorn D.C. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *J. Dairy Sci.* 2013. V. 96, № 10. P. 6127—6146.
3. Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A. *Dairy Chemistry and Biochemistry* (Second Edition). New York: Springer, 2015. 585 p.
4. Pinto G., Caira S., Cuollo M. et al. Bioactive Casein Phosphopeptides in Dairy Products as Nutraceuticals for Functional Foods. In: *Milk Proteins*, Hurley W.L. (ed.). Croatia: In Tech, 2012. P. 3—44.
5. McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A. *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. Fourth Edition. New York: Springer, 2016. 498 p.
6. Myronovskij S., Negrych N., Nehrych T. et al. Isolation and characterization of peptides from blood serum of patients with multiple sclerosis. *Studia Biologica*. 2015. Vol. 9, № 2. P. 5—12.
7. Юкало А.В., Сторож Л.А., Юкало В.Г. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 4. С. 21—33.
8. Yukalo V. Obtaining of casein protein complex from cow milk. *Nutracos*. 2005. № 5. P. 17—19.
9. Yukalo A., Yukalo V., Shynkaryk M. Electrophoretic Separation of the Milk Protein. *Proceeding of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies*, 22—23 October 2009. Compiegne (France). 2009. P. 227—231.
10. Юкало В.Г., Сторож Л.А., Штокало М.О. Визначення умов отримання природних біоактивних казеїнових фосфопептидів. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2014. Т. 16, № 3(60), Ч. 4. С. 192—200.